

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

Record 1

011559405

WPI Acc No: 97-535886/199749

Treatment of myocardial infarction using anti-IL8 antibody - also useful for treatment of unstable angina and myocardial ischaemic reflux disturbances

----- Database Copyright ----- 11-23-1999 / 13:00:11 EST -----

World Patents data comes from the World Patents Index database which is prepared 1999 by Derwent Information, Ltd., London, England and made available by The Dialog Corporation plc.

Record 1

011559405

WPI Acc No: 97-535886/199749

XRAM Acc No: C97-171442

Treatment of myocardial infarction using anti-IL8 antibody - also useful for treatment of unstable angina and myocardial ischaemic reflux disturbances

Patent Assignee: CHUGAI SEIYAKU KK (CHUS ); CHUGAI PHARM CO LTD (CHUS )

Inventor: KOGA T; MATSUMORI A; MATSUSHIMA K

Number of Countries: 075 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
WO 9740215	A1	19971030	WO 97JP1405	A	19970423	A61K-039/395	199749 B
AU 9724051	A	19971112	AU 9724051	A	19970423	C07K-016/24	199811
JP 10053536	A	19980224	JP 97106225	A	19970423	A61K-039/395	199818

Priority Applications (No Type Date): JP 96137358 A 19960423

Cited Patents: 3.Jnl.Ref; WO 9602576

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing Notes	Application	Patent
--------	------	-----	----	--------------	-------------	--------

WO 9740215	A1	J	40			
------------	----	---	----	--	--	--

Designated States (National): AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CU CZ DE DK EE ES FI GB GE GH HU IL IS KE KG KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK TJ TM TR TT UA UG US UZ VN YU

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK EA ES FI FR GB GH GR IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SZ UG

AU 9724051	A		Based on		WO 9740215
------------	---	--	----------	--	------------

JP 10053536	A	13			
-------------	---	----	--	--	--

Abstract (Basic): WO 9740215 A

Treatment of myocardial infarction, unstable angina and myocardial ischemic flow disturbance using anti-IL8 antibody. The antibody which recognises human IL-8 may be polyclonal or monoclonal, an example being humanised or chimeric WS-4 antibody.

USE - The antibody is used to treat conditions associated with heart-lung bypass surgery, surgery requiring interruption of heart function, or heart transplantation. The antibody is administered at 5-2000 mg/patient.

Dwg.1/2

Title Terms: TREAT; MYOCARDIUM; INFARCTION; ANTI; ANTIBODY; USEFUL; TREAT;  
UNSTABLE; ANGINA; MYOCARDIUM; ISCHAEMIC; REFLUX; DISTURB

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-039/395

International Patent Class (Additional): C07K-016/24; C12N-015/02;

C12N-015/09; C12P-021/08; C12R-001-91

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-G21; B14-F01B; B14-F01D; D05-H09; D05-H11A;  
D05-H11B

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M781 M903 P522 P523 Q233 V600 V611



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C61K 39/395 // C07K 16/24, C12P 21/08</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/40215</p> <p>(43) 国際公開日 1997年10月30日(30.10.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01405</p> <p>(22) 国際出願日 1997年4月23日(23.04.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/137358 1996年4月23日(23.04.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 松森 昭(MATSUMORI, Akira)[JP/JP] 〒562 大阪府箕面市瀬川5丁目16-22 Osaka, (JP) 松島綱治(MATSUSHIMA, Kouji)[JP/JP] 〒921 石川県金沢市つつじが丘210-9 Ishikawa, (JP) 古賀隆樹(KOGA, Takaki)[JP/JP] 〒412 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: MYOCARDIAL INFARCTION REMEDY CONTAINING ANTI-IL-8 ANTIBODY AS ACTIVE INGREDIENT</p> <p>(54)発明の名称 抗 IL-8 抗体を有効成分として含有する心筋梗塞治療剤</p> <p>(57) Abstract A remedy for myocardial infarction, unstable angina and myocardial ischemic reflow disturbance, containing an anti-IL-8 antibody as the active ingredient.</p>		

(57) 要約

抗IL-8抗体を有効成分として含有する心筋梗塞治療剤、不安定狭心症治療剤及び心筋虚血再灌流障害治療剤。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MK	マケドニア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MN	モンゴリア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MW	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IS	アイスランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IT	イタリア	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KE	ケニア	NO	ノルウェー		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
EE	エストニア	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
		LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
		LK	スリランカ	SE	スウェーデン		

## 明 細 書

抗IL-8抗体を有効成分として含有する心筋梗塞治療剤

## 技術分野

本発明は抗インターロイキン-8 (IL-8) 抗体を有効成分として含有する心筋梗塞治療剤に関する。また、本発明は抗IL-8抗体を有効成分として含有する不安定狭心症治療剤に関する。さらに、本発明は抗IL-8抗体を有効成分として含有する心筋虚血再灌流障害治療剤に関する。

## 背景技術

IL-8は、C-X-C ケモカインサブファミリーに属する蛋白質であり、以前は単球由来好中球遊走因子 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor)、好中球活性化蛋白-1 (neutrophil attractant/activation protein-1)、好中球活性化因子 (neutrophil activating factor) 等と呼称されていた。IL-8は、好中球を活性化させ好中球に遊走能を獲得させる因子であり、IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカイン (Koch, A. E. et al., J. Investig. Med. (1995) 43, 28-38 ; Larsen, C. G. et al., Immunology (1989) 68, 31-36) やPMA, LPS等のマイトゲン (Yoshimura, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., (1987) 84, 9233-9237)、さらにはカドミウム等の重金属 (Horiguchi, H. et al., Lymphokine Cytokine Res. (1993) 12, 421-428) 等の刺激によって様々な細胞から産生される。また、低酸素状態に置かれたヒト臍帯静脈内皮細胞がIL-8を発現することも知られている (Karakurum, M. et al., J. Clin. Invest. (1994) 93, 1564-1570)。

心筋梗塞、狭心症等の虚血性心疾患、あるいは心-肺バイパス術施術時、人為的心停止を行う手術時、心臓移植時における冠血流量の低下あるいは途絶による酸素供給量の低下は、心筋細胞のエネルギー産生を阻害し、心機能の低下、さらには心筋細胞の不可逆的な細胞傷害をもたらす。

そのため、虚血性心疾患発症時には速やかな血行の回復が求められる。しかし、虚血後に冠血管の血行回復を求めて再灌流を行って酸素供給を再開させた時、不整脈が生じること (Manning, A. S. and Hearse, D. J., *J. Mol. Cell Cardiol.* (1984) 16, 497-518)、あるいは心筋壊死や気絶心筋の様な心筋傷害がむしろ増悪されることもよく知られている (Opie, L., *Cardiovasc. Res.* (1992) 26, 20-24 ; Hearse, D. J. and Bolli, R., *Cardiovasc. Res.* (1992) 26, 101-108)。このような現象は一般に虚血再灌流障害と呼ばれている。虚血性心疾患患者に対して血流を回復させる目的で、冠動脈血栓溶解療法、経皮的冠動脈形成術 (PTCA)、あるいは冠動脈バイパス術 (CABG) などの再灌流療法が普及しており、現在、虚血再灌流障害は臨床的にも重要な問題と認識されつつある。

心-肺バイパス術施術後の動脈血 (Finn, A. et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* (1993) 105, 234-241)、および心臓移植後の冠静脈洞の血液中 (Oz, M. C. et al., *Circulation* (1995) 92, suppl II 428-432) に IL-8 が検出されており、IL-8 がその炎症過程に関与する事が示唆されているが、それぞれの虚血再灌流障害の病態形成に対する正確な役割は不明である。

肺虚血再灌流障害の動物実験モデルにおいては、2時間の肺虚血後、再灌流時に抗 IL-8 抗体を投与することにより、肺組織傷害が抑制されたことが既に報告されている (Sekido, N. et al., *Nature* (1993) 365, 654-657)。一方、心筋虚血再灌流障害モデルにおいて

は、再灌流後の心筋組織でのIL-8発現については報告されているものの (Ivey, C. L. et al., J. Clin. Invest. (1995) 95, 2720-2728; Kukielka, G. L. et al., J. Clin. Invest. (1995) 95, 89-103)、IL-8を中和することによる効果については不明であった。むしろ、再灌流によって増加するIL-8自身を再灌流前に投与することにより、心筋梗塞巣の形成が抑制されたことが報告されている (Lefer, A.M. et al., Br. J. Pharmacol. (1991) 103, 1153-1159)。また、補体成分のC5a (Ivey, C. L. et al., J. Clin. Invest. (1995) 95, 2720-2728)、あるいはロイコトリエンB<sub>4</sub> (Katori, M. et al., Japan. J. Pharmacol. (1989) 50, 234-238)等のIL-8以外の好中球遊走因子が心筋虚血再灌流モデルで好中球の心筋梗塞巣への遊走に関与しており、それぞれの活性を失わせることで梗塞巣形成抑制効果が得られている。さらに、心筋梗塞患者の末梢血中にはIL-8が検出されなかったことから、心筋梗塞におけるIL-8の関与を否定する考えもある (Siminiak, T. et al., Basic Res Cardiol. (1993) 88, 150-154)。従って、心筋梗塞などを含む心筋虚血再灌流障害においては、抗IL-8抗体の投与により心筋梗塞巣の形成が抑制されるか否か不明であった。

これまで心筋梗塞に対し冠血管拡張や心負荷軽減の目的で亜硝酸剤、カルシウム拮抗薬、ベータ受容体拮抗薬等、また再発予防的に抗血小板薬が用いられてきた。また、血栓溶解療法やPTCA、CABGなどの再灌流療法も最近では一般的である。しかし、再灌流療法に伴う心筋傷害に対して直接改善作用を有するとされる薬剤は現在認められていない。

また、心-肺バイパス術施術後、心停止を行う手術後、心臓移植後の虚血再灌流障害に対する有効な治療薬も存在しない。

このように、心筋梗塞、不安定狭心症および心筋虚血再灌流障害



のための有効な治療剤はまだなく、その開発が要望されていた。

本発明の目的は、かかる疾患のための新しい治療剤を提供することである。

#### 発明の開示

本発明者らは、かかる治療剤を提供すべく鋭意研究を重ねた結果、抗IL-8抗体により、所期の目的が達成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、抗IL-8抗体を有効成分として含有する心筋梗塞治療剤を提供する。

本発明はまた、抗IL-8抗体を有効成分として含有する急性心筋梗塞治療剤を提供する。

本発明はまた、抗IL-8抗体を有効成分として含有する不安定狭心症治療剤を提供する。

本発明はまた、抗IL-8抗体を有効成分として含有する心筋虚血再灌流障害治療剤を提供する。

本発明はまた、抗IL-8抗体を有効成分として含有する心-肺バイパス術施術に伴う心筋虚血再灌流障害治療剤を提供する。

本発明はまた、抗IL-8抗体を有効成分として含有する人為的心停止を行う手術に伴う心筋虚血再灌流障害治療剤を提供する。

本発明はまた、抗IL-8抗体を有効成分として含有する心臓移植に伴う心筋虚血再灌流障害治療剤を提供する。

本発明はまた、抗IL-8モノクローナル抗体を有効成分として含有する心筋梗塞治療剤、不安定狭心症治療剤、または心筋虚血再灌流障害治療剤を提供する。

本発明はまた、哺乳類のIL-8に対する抗体を有効成分として含有する心筋梗塞治療剤、不安定狭心症治療剤、または心筋虚血再灌流

障害治療剤を提供する。

本発明はまた、ヒトIL-8に対する抗体を有効成分として含有する心筋梗塞治療剤、不安定狭心症治療剤、または心筋虚血再灌流障害治療剤を提供する。

本発明はまた、WS-4抗体を有効成分として含有する心筋梗塞治療剤、不安定狭心症治療剤、または心筋虚血再灌流障害治療剤を提供する。

本発明はまた、ヒト型化またはキメラ化された抗IL-8抗体を有効成分として含有する心筋梗塞治療剤、不安定狭心症治療剤、または心筋虚血再灌流障害治療剤を提供する。

本発明はさらに、ヒト型化WS-4抗体を有効成分として含有する心筋梗塞治療剤、不安定狭心症治療剤、または心筋虚血再灌流障害治療剤を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ウサギ心筋梗塞モデルにおける血漿中のCK活性を経時的に測定し、WS-4抗体投与群の平均値を陰性対照である溶媒投与群の平均値と比較したグラフである。

図2は、ウサギ心筋梗塞モデルにおける血漿中のLDH活性を経時的に測定し、WS-4抗体投与群の平均値を陰性対照である溶媒投与群の平均値と比較したグラフである。

#### 発明の実施の形態

##### 1. 抗IL-8抗体

本発明で使用する抗IL-8抗体は、心筋梗塞、不安定狭心症および心筋虚血再灌流障害の治療効果を有するものであれば、その由来、種類（モノクローナル、ポリクローナル）および形状を問わない

。

本発明で使用する抗IL-8抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用する抗IL-8抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-8と結合することにより、好中球等に発現されているIL-8レセプターへの結合を阻害してIL-8のシグナル伝達を遮断し、IL-8の生物学的活性を阻害する抗体である。

このような抗体としては、WS-4抗体 (Ko, Y. et al., J. Immunol. Methods (1992) 149, 227-235) やDM/C7 抗体 (Mulligan, M. S. et al., J. Immunol. (1993) 150, 5585-5595), Pep-1 抗体およびPep-3 抗体 (国際特許出願公開番号WO 92/04372) または6G4.2.5 抗体およびA5.12.14抗体 (国際特許出願公開番号WO 95/23865; Boylan, A.M. et al., J. Clin. Invest. (1992) 89, 1257-1267) 等が挙げられる。これらのうちで、特に好ましい抗体としてWS-4抗体が挙げられる。

なお、WS-4抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、Mouse hybridoma WS-4として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成8年4月17日に、FERM BP-5507としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

## 2. 抗体産生ハイブリドーマ

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-8を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と

融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるIL-8は、ヒトIL-8については、Matsushima, K. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1883-1893 に、ウサギIL-8についてはHarada, A. et al., Int. Immunol. (1993) 5, 681-690に、イヌIL-8についてはIshikawa, J. et al., Gene (1993) 131, 305-306 に、ヒツジIL-8についてはSeow, H.F. et al., Immunol. Cell Biol. (1994) 72, 398-405 に、サルIL-8についてはVillinger, F. et al., J. Immunol. (1995) 155, 3946-3954 に、モルモットIL-8についてはYoshimura, T. and Johnson, D. G., J. Immunol. (1993) 151, 6225-6236に、ブタIL-8についてはGoodman, R. B. et al., Biochemistry (1992) 31, 10483-10490 に開示された、それぞれのIL-8遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

ヒトIL-8は、種々の細胞で産生され、N末端において異なるプロセッシングを受けることが報告されている (Leonard, E. J. et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. (1990) 2, 479-486)。これまでに、79, 77, 72, 71, 70および69のアミノ酸残基数を有するIL-8が知られているが、本発明で使用される抗IL-8抗体取得のための抗原として使用され得る限りそのアミノ酸残基数を問わない。

IL-8の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のIL-8タンパク質を公知の方法で精製し、この精製IL-8タンパク質を感作抗原として用いればよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択す

るのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞としては、既に公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (Kearney, J. F. et al., J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3x63Ag8U.1 (Yelton, D. E. et al., Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), FO (de St. Groth, S. F. and Scheidegger, D., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方

法、例えば、ミルステインらの方法 (Galfre, G. and Milstein, C. , Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG 溶液、例えば、平均分子量1000-6000 程度のPEG 溶液を通常、30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えば、HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。当該HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリー

ニングおよび単一クローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroでIL-8に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、IL-8への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878 参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるIL-8を免疫して抗IL-8抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞を用いてIL-8に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO 92/03918 , WO 93/12227 , WO 94/02602 , WO 94/25585 , WO 96/33735 およびWO 96/34096 参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に移植して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

### 3. 組換え型抗体

モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を本発明に用いることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。

具体的には、抗IL-8抗体を産生するハイブリドーマから、抗IL-8抗体の可変領域（V領域）をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia）等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia）を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit（生化学工業）等を用いて行うこともできる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech）およびポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction；PCR）を用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988) 85, 8998-9002；Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932）を使用することができる。

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認する。

目的とする抗IL-8抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを既に含む発現ベクターに組み込んで



もよい。

本発明で使用する抗IL-8抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

抗体遺伝子の発現は、抗体の重鎖（H鎖）または軽鎖（L鎖）をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで、宿主細胞を形質転換させてもよい（国際特許出願公開番号WO 94/11523 参照）。

#### 4. 改変抗体

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た、ヒト抗体以外の抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 96/02576 参照）。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

なお、キメラWS-4抗体のL鎖またはH鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々Escherichia coli DH5 $\alpha$ （HEF-chWS4L-g $\kappa$ ）およびEscherichia coli JM109（HEF-chWS4H-g $\gamma$ 1）として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成6年7月12日に、各々FERM BP-4739およびFERM BP-4740としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (complementarity determining region: CDR) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号 EP 125023、国際特許出願公開番号 WO 96/02576 参照)。

具体的には、マウス抗体の CDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region: FR) を連結するように設計した DNA 配列を、末端部で互いにオーバーラップする部分を有する数本のオリゴヌクレオチドに分割して合成し、PCR 法により一本に統合した DNA に合成する。得られた DNA をヒト抗体 C 領域をコードする DNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号 EP 239400、国際特許出願公開番号 WO 96/02576 参照)。

CDR を介して連結されるヒト抗体の FR は、CDR が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、ヒト型化抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の V 領域の FR のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

キメラ抗体ならびにヒト型化抗体には、目的によってヒト抗体 C 領域が使用され、例えば、C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 4 を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体 C 領域を修飾してもよい。例えば、抗体のサブクラスを IgG4 に選択する場合、IgG4 のヒンジ領域の一部のアミノ酸配列 CPSCP を IgG1 のヒンジ領域のアミノ酸配列 CPPCP に変換する事により、IgG4 の構造的不安定性を解消できる (Angal, S. et al., Mol. Immunol. (1993) 30, 105-108)。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体のV領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体のCDRとヒト抗体由来のFRおよびC領域からなり、ヒト以外の哺乳動物由来のアミノ酸配列が最小限度に減少しているため、ヒト体内における抗原性が低下し、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明に使用できるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化WS-4抗体が挙げられる（国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。ヒト型化WS-4抗体は、マウス由来のWS-4抗体のCDRを、L鎖についてはヒト抗体REIのFRと、H鎖についてはヒト抗体VDH26のFR1-3およびヒト抗体4B4のFR4と連結し、抗原結合活性を有するようにFRのアミノ酸残基を一部置換したものである。

なお、ヒト型化WS-4抗体のL鎖またはH鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (HEF-RVLa-g $\kappa$ ) および*Escherichia coli* JM109 (HEF-RVHg-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成6年7月12日に、各々FERM BP-4738およびFERM BP-4741としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

#### 5. 抗体修飾物

本発明で使用される抗体は、IL-8に結合し、IL-8の活性を阻害するかぎり、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab, F(ab')<sub>2</sub>, FvまたはH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152

, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol . (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol . (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリッカーを介して連結される (Huston, J. S . et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) 。 scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリッカーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖または、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖または、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリッカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

また、一旦scFvをコードするDNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本願特許請求の範囲で

いう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（PEG）等の各種分子と結合した抗IL-8抗体を使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

#### 6. 組換え型抗体または改変抗体の発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAを含む発現ベクターにて発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー（human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer）を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40（SV 40）等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 $\alpha$ （HEF1 $\alpha$ ）などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulligan, R. C. らの方法（Nature (1979) 277, 108-114）、また、HEF1 $\alpha$  プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima, S らの方法（Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322）に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、*lacZ*プロモーター、*araB*プロモーターを挙げることができる。*lacZ*プロモーターを使用する場合、Ward, E. S. らの方法 (Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) に、また *araB*、プロモーターを使用する場合、Better, M. らの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、*pelB*シグナル配列 (Lei, S. P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して (refold) 使用する (例えば、国際特許出願公開番号 WO 96/30394 参照)。

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシバピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (*dhfr*) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用する抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができ、抗体製造のための産生系は、*in vitro* および *in vivo* の産生系がある。

*in vitro* の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用い

る産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5 が知られている。植物細胞としては、例えば、ニコティアナ (Nicotiana) 属、詳しくは、ニコティアナ タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、(1) 酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、詳しくは、サッカロミセスセレビジエ (Saccharomyces cerevisiae)、あるいは(2) 糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、詳しくは、アスペルギルス ニガー (Aspergillus niger) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (Escherichia coli)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、哺乳類細胞用の培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM等を使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移植することにより、in vivo にて抗体を産生してもよい。

更なるin vivo の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Glaser, V., SPECTRUM Biotechnology Applicati

ons, 1993 )。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。

植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ $\beta$ カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。

胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702 )。

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る(Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム チューメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコティアナ タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る(Ma, J. K. et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138 )。

上述のようにin vitroまたはin vivo の産生系にて抗体を産生する場合、抗体H鎖またはL鎖をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖



および鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい（国際特許出願公開番号WO 94/11523参照）。

#### 7. 抗体の分離、精製

前記のように発現、産生された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia) 等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Antibodies : A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。

#### 8. 抗体の濃度測定

7で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定または酵素結合免疫吸着検定法 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) 等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、

得られた抗体をPBS で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、種およびサブクラスにより吸光係数は異なるが、ヒト抗体の場合1 mg/ml を1.4 ODとして算出する。また、ELISA による場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液（pH 9.6）で1  $\mu$ g/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG 抗体100  $\mu$ l を96穴プレート（Nunc）に加え、4℃で一晩インキュベーションし、抗体を固相化する。ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体または抗体を含むサンプル、あるいは濃度標準品として既知の濃度のヒトIgG100  $\mu$ l を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG 抗体100  $\mu$ l を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550（Bio-Rad）を用いて405nm での吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を濃度標準ヒトIgG の吸光度より算出する。

#### 9. 抗体の活性の確認

本発明で使用される抗体の抗原結合活性（Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）、リガンドレセプター結合阻害活性（Harada, A. et al., Int. Immunol. (1993) 5, 681-690）の測定には公知の手段を使用することができる。

本発明で使用される抗IL-8抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、ELISA を用いる場合、IL-8に対するポリクローナル抗体を固相化した96穴プレートにIL-8を添加し、次いで目的の抗IL-8抗体を含む試料、例えば、抗IL-8抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した目的の抗IL-8抗体を認識する二次

抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。

本発明で使用される抗IL-8抗体のリガンドレセプター結合阻害活性を測定する方法としては、通常のCell ELISA、あるいは、リガンドレセプター結合アッセイを用いることができる。

例えば、Cell ELISA法の場合、IL-8レセプターを発現する血液細胞あるいは癌細胞、例えば、好中球を96穴プレートで培養して接着させ、パラホルムアルデヒドなどで固定化する。あるいは、IL-8レセプターを発現する細胞の膜分画を調製して固相化した96穴プレートを作製する。これに、目的の抗IL-8抗体を含む試料、例えば、抗IL-8抗体産生細胞の培養上清や精製抗体と、放射性同位元素、例えば、 $^{125}\text{I}$ 等で標識したIL-8を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、放射活性を測定することでIL-8レセプターに結合したIL-8量を測定でき、抗IL-8抗体のリガンドレセプター結合阻害活性を評価することができる。

例えば、細胞上のIL-8レセプターに対するIL-8の結合阻害アッセイには、IL-8レセプターを発現する血液細胞あるいは癌細胞、例えば好中球を遠心分離等の手段で分離した後、細胞懸濁液として調製する。放射性同位元素、例えば、 $^{125}\text{I}$ 等で標識したIL-8溶液、あるいは非標識のIL-8と標識IL-8の混合溶液と、濃度調製した抗IL-8抗体を含む溶液を細胞懸濁液に添加する。一定時間の後、細胞を分離し、細胞上に結合した標識IL-8の放射活性を測定すればよい。

また、本発明で使用される抗IL-8抗体の好中球遊走（ケモタキシス；chemotaxis）に対する阻害能を測定する方法として、公知の通常知られている方法、例えば、Grob, P.M. らの方法（J. Biol. Chem. (1990) 265, 8311-8316）を用いることができる。

具体的には、市販されているケモタキシスチャンバーを用い、抗IL-8抗体を培養液、例えば、RPMI 1640、DMEM、MEM、IMDM等で希釈した後、IL-8を加え、これをフィルターで仕切られたチャンバー下層に分注する。次いで、調製した細胞懸濁液、例えば好中球懸濁液をチャンバー上層に添加し、一定時間放置する。遊走する細胞はチャンバーに装着されたフィルター下面に付着するので、その細胞の数を染色液あるいは蛍光抗体等を用いた方法で測定すればよい。また、顕微鏡下での肉眼による判定や計測器を用いた自動測定も可能である。

#### 10. 投与方法および製剤

本発明の抗IL-8抗体を有効成分として含有する治療剤は、非経口的に、例えば、点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身あるいは局部的に投与することができる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。

本発明の抗IL-8抗体を有効成分として含有する治療剤は、病気に既に悩まされる患者に、病気およびその合併症の症状を治癒するか、あるいは少なくとも部分的に阻止するために十分な量で投与される。例えば、有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.01mgから1000mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり5-2000mg/bodyの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の抗IL-8抗体を含有する治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

また、投与時期としては、心筋梗塞、不安定狭心症または心筋虚血再灌流障害が生じてから投与してもよいし、あるいは、一時的に血流が遮断された後の再灌流時や血栓溶解剤の使用あるいはPTCA施術後で再灌流が予測される時に投与してもよい。

本発明の抗IL-8抗体を有効成分として含有する治療剤は、常法にしたがって製剤化することができ (Remington's Pharmaceutical S

science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, 米国)、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

実際の添加物は、本発明治療剤の剤形に応じて上記の中から適宜あるいは組み合わせて選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。

例えば、注射用剤として使用する場合、精製された抗IL-8抗体を溶剤、例えば、生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、それに、吸着防止剤、例えば、Tween 80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。または、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

心筋梗塞、不安定狭心症あるいは心筋虚血再灌流障害などにより心筋細胞への血液供給が低下または途絶すると、心筋細胞が傷害を受ける。その際、傷害を受けた心筋細胞から血中へクレアチンキナ

ーゼ（CK）やラクテートデヒドロゲナーゼ（LDH）が遊離し、血中のそれらの酵素活性が増加することが知られている。そのため、これらは上記疾患の障害の程度を表すための指標として臨床的に使用されている。後述の実施例に示したように、本発明の抗IL-8抗体またはその断片を有効成分として含有する治療剤は、上記疾患の実験系として知られているウサギ冠動脈左回旋枝結紮モデルにおいて血中CK活性およびLDH活性のレベルを低下させた。

したがって、本発明の抗IL-8抗体またはその断片を有効成分として含有する治療剤は、心筋梗塞、不安定狭心症および心筋虚血再灌流障害の治療剤として有用である。

#### 実施例

以下、実施例、参考例および実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 参考例 1. ヒトIL-8に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

ヒトIL-8を常法によりBALB/cマウスに免疫し、免疫が成立したマウスより脾細胞を採取した。ポリエチレングリコールを使用する常法によりこの脾細胞をマウス骨髓腫細胞P3X63Ag8.653と融合させ、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製した。ヒトIL-8に対する結合活性を指標としてスクリーニングを行った結果、ハイブリドーマ細胞株WS-4を得た。また、ハイブリドーマWS-4が産生する抗体は、ヒトIL-8の好中球への結合を阻害し中和活性を有していた。（Ko, Y. et al., J. Immunol. Methods (1992) 149, 227-235）。

ハイブリドーマWS-4が産生する抗体のH鎖およびL鎖のアイソタイプを、マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキットを用い

て調べた。その結果、ハイブリドーマWS-4が産生する抗体は、マウス $\kappa$ 型L鎖およびマウス $\gamma$ 1型H鎖を有することが明らかになった。

なお、ハイブリドーマ細胞株WS-4は、Mouse hybridoma WS-4として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年4月17日に、FERM BP-5507としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。

#### 参考例2. ヒトIL-8に対するヒト型化抗体の作製

ヒト型化WS-4抗体を国際特許出願公開番号WO 96-02576 に記載の方法により作製した。

参考例1で作製されたハイブリドーマWS-4から、常法により全RNAを調製し、これより一本鎖cDNAを合成した。PCR法により、マウスWS-4抗体のH鎖ならびにL鎖のV領域をコードするDNAを増幅した。PCR法に使用したプライマーは、Jones, S. T. and Bendig, M. M., Bio/Technology (1991) 9, 88-89に記載されているプライマーを用いた。PCR法で増幅したDNA断片を精製し、マウスWS-4抗体L鎖V領域をコードする遺伝子を含むDNA断片およびマウスWS-4抗体H鎖V領域をコードする遺伝子を含むDNA断片を単離した。これらのDNA断片を各々プラスミドpUC系クローニングベクターに連結し、大腸菌コンピテント細胞に導入して大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を常法により培養し、得られた菌体から上記DNA断片を含むプラスミドを精製した。プラスミド中のV領域をコードするDNAの塩基配列を常法に従って決定し、そのアミノ酸配列から各々のV領域のCDRを特定した。

キメラWS-4抗体を発現するベクターを作製するため、マウスWS-4抗体のL鎖およびH鎖のV領域をコードするcDNAを、予めヒトC領域をコードするDNAを連結してあるHEFベクターにそれぞれ別に挿

入した。

ヒト型化WS-4抗体を作製するために、CDR 移植法による遺伝子工学的手法を用いてマウスWS-4抗体のV 領域CDR をヒト抗体へ移植した。適切な抗原結合部位を形成させるため、CDR を移植した抗体のV 領域のFRのアミノ酸を一部置換する為のDNA 配列の置換をおこなった。

このようにして作製したヒト型化WS-4抗体のL 鎖およびH 鎖のV 領域を、抗体として哺乳類細胞で発現させるために、各々をコードするDNA をHEF ベクターに別々に挿入し、ヒト型化WS-4抗体のL 鎖またはH 鎖を発現するベクターを作製した。

これら二つの発現ベクターをCOS 細胞に同時に挿入することにより、ヒト型化WS-4抗体を産生する細胞株を樹立した。この細胞株を培養して得られたヒト型化WS-4抗体のIL-8への結合能およびIL-8中和能を、各々ELISA およびIL-8/ 好中球結合阻害試験にて調べた。その結果、ヒト型化WS-4抗体は、マウスWS-4抗体と同程度に、ヒトIL-8に結合してIL-8の好中球への結合を阻害することが判明した。

なお、ヒト型化WS-4抗体のL 鎖およびH 鎖を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々Escherichia coli DH5 $\alpha$  (HEF-RVLa-g $\kappa$ ) およびEscherichia coli JM109 (HEF-RVHg-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1 丁目1 番3 号）に、平成6 年7 月12日に、各々FERM BP-4738およびFERM BP-4741としてブダベスト条約に基づき国際寄託された。

#### 実施例 1.

ニュージーランド白色種ウサギ（1 群n=3、雄）をネンブタール（ダイナボット、投与量25-30mg/kg体重）を耳介静脈より投与して麻酔し、仰臥位に保定後、前頸部・胸部・左右大腿部を剃毛した。左大腿部を切開後、大腿動脈を確保、カテーテルを留置して血圧モ



ニター（日本光電）に接続し血圧を実験終了まで連続的に測定した。右大腿部を切開後、大腿動脈ならびに大腿静脈を確保し、それぞれにカテーテルを留置して採血と投与に使用した。

前頸部縦切開にて気管を露出、気管切開により気管内挿管チューブを挿入し、人工呼吸下で電気メス及び開胸器を用い開胸した。その際、血中酸素分圧を130-140mmHgに保持するため、吸気に混合ガス（酸素95%、二酸化炭素5%）を約0.2 l/min 付加した。心臓露出、心嚢膜切開後、冠動脈左回旋枝に糸をかけ、心電図計（日本光電）の電極を四肢にセット後、1時間静置した。CK活性およびLDH活性の測定のため、大腿静脈よりヘパリン（シミズ）採血により0.5mlの血液を採取し、以降経時的に同様の処置を施した。ポリエチレンチューブ（ヒビキsize6）及び改造を加えた動脈クレンメ（ナツメ）を用い冠動脈左回旋枝を結紮して、虚血部の変色と心電図上のSTセグメント上昇を確認して虚血状態とした。

結紮24分後から1分間かけて、濃度5mg/ml（溶媒：Na-Naリン酸緩衝液pH6.0）のヒトIL-8に対するマウスWS-4抗体（投与量5mg/kg体重、1ml/kg体重）、あるいは陰性対照として溶媒（1ml/kg体重）を大腿静脈より投与した。5分後（結紮30分後）に結紮を解き再灌流とした。5時間再灌流した後、0.5mlヘパリン溶液及び10ml飽和塩化カリウムを大腿静脈より投与し犠牲死させた。経時的に採取した血液中のCK活性及びLDH活性を、測定キット（ナックルCK [NAC-810]：ヤトロン、LDH [NAC-228]：SIGMA DIAGNOSTICS）を用いて測定した。

血中CK活性の経時的变化を表1ならびに図1に、また、LDH活性の経時的变化を表2ならびに図2にそれぞれ示す。

表1. 溶媒投与群およびWS-4抗体投与群の血中CK活性の経時的変化

	虚血前	虚 血 30分後	再灌流 1 時間後	再灌流 2 時間後	再灌流 3 時間後	再灌流 4 時間後	再灌流 5 時間後
溶媒投与 個体 1	32.4	47.5	171	198	215	229	244
溶媒投与 個体 2	25.6	34.5	157	199	207	214	222
溶媒投与 個体 3	49.8	70.3	284	342	370	421	489
溶媒投与群 の平均値	35.9	50.8	204	246	264	288	318

	虚血前	虚 血 30分後	再灌流 1 時間後	再灌流 2 時間後	再灌流 3 時間後	再灌流 4 時間後	再灌流 5 時間後
WS-4抗体 投与 個体 1	34.2	46.1	201	233	258	239	253
WS-4抗体 投与 個体 2	63.4	77.2	141	161	170	171	163
WS-4抗体 投与 個体 3	25.5	39.4	187	261	251	253	248
WS-4抗体 投与群の 平均値	41.0	54.2	176	218	226	221	221

(単位：国際単位/g血漿蛋白)

表2. 溶媒投与群およびWS-4抗体投与群の血中LDH 活性の経時的変化

	虚血前	虚 血 30分後	再灌流 1 時間後	再灌流 2 時間後	再灌流 3 時間後	再灌流 4 時間後	再灌流 5 時間後
溶媒投与 個体 1	3.27	3.58	8.48	6.83	5.88	5.39	5.64
溶媒投与 個体 2	2.81	2.62	7.90	5.93	4.35	3.45	3.78
溶媒投与 個体 3	3.91	4.75	17.0	14.4	11.4	11.6	10.9
溶媒投与群 の平均値	3.33	3.65	11.1	9.05	7.21	6.81	6.77

	虚血前	虚 血 30分後	再灌流 1 時間後	再灌流 2 時間後	再灌流 3 時間後	再灌流 4 時間後	再灌流 5 時間後
WS-4抗体 投与 個体 1	2.43	2.71	9.36	6.85	4.89	4.07	3.72
WS-4抗体 投与 個体 2	3.61	3.80	7.45	5.73	4.86	4.77	3.94
WS-4抗体 投与 個体 3	2.92	3.06	10.7	7.53	5.62	4.65	4.04
WS-4抗体 投与群の 平均値	2.99	3.19	9.17	6.70	5.12	4.50	3.90

(単位：国際単位/g血漿蛋白)

血中CK活性の推移は、溶媒投与群の平均値は再灌流する事により急激に上昇し、その後時間経過とともに漸増した。しかしながら、WS-4抗体投与群のそれは、再灌流する事により急激に上昇したものの、溶媒投与群の平均値よりも低く、その後は一定値を保持し上昇を抑制した。このことから、WS-4抗体の投与により心筋細胞障害の指標である血中CK活性の増加が抑制される事が示された（図1）。

血中LDH活性の推移は、溶媒投与群の平均値は再灌流する事により急激に上昇し、その後時間経過とともに漸減した。しかしながら、WS-4抗体投与群のそれは、再灌流する事により急激に上昇したものの、その値は溶媒投与群よりも低く、その後の減少の度合いも溶媒投与群より強かった。このことから、WS-4抗体の投与により心筋細胞障害の指標である血中LDH活性の増加が抑制される事が示された（図2）。

これらの結果は、虚血再灌流により心筋細胞が傷害を受けて生じるCKならびにLDHの血中への遊離を、WS-4抗体が抑制したこと示しており、WS-4抗体が虚血再灌流障害に対して心筋細胞を保護した事を意味している。従って、心筋梗塞などを含めた心筋虚血再灌流障害に対する治療薬として有用であることが示された。

#### 実施例 2.

犠牲死後に心臓を摘出し、以下の処理を施すことにより梗塞巣の定量が可能である。摘出心臓の大動脈より逆行性に生理食塩水（大塚製薬）10mlを注入して血液を除去し、続いて、左回旋枝に留置しておいた虚血に用いた糸を再び結紮し大動脈より逆行性に1%エバンスブルー溶液（溶媒：生理食塩水）5mlを注入する。摘出心臓をエバンスブルーで染色された正常灌流部とエバンスブルーで染色されない虚血領域に分離し、虚血領域は37℃の1%トリフェニルテトラゾリウムクロライド（シグマ、TTC）溶液中で10分間インキュベート

する。その後、更にTTCで染色された虚血領域非壊死部とTTCで染色されない虚血領域壊死部に分離する。その後、正常灌流部位、虚血領域非壊死部、虚血領域壊死部の各々の組織重量を測定することにより、梗塞巣の定量が可能である。

#### 産業上の利用可能性

抗IL-8抗体の投与によりCK活性並びにLDH活性の血中レベルが低下された。この事実は、抗IL-8抗体が心筋梗塞、不安定狭心症および心筋虚血再灌流障害の治療剤として有用であることを示す。

## 請 求 の 範 囲

1. 抗IL-8抗体を有効成分として含有する心筋梗塞治療剤。
2. 心筋梗塞が急性心筋梗塞であることを特徴とする、請求項1に記載の治療剤。
3. 抗IL-8抗体を有効成分として含有する不安定狭心症治療剤。
4. 抗IL-8抗体を有効成分として含有する心筋虚血再灌流障害治療剤。
5. 心筋虚血再灌流障害が心-肺バイパス術施術に伴うことを特徴とする、請求項4に記載の治療剤。
6. 心筋虚血再灌流障害が人為的心停止を行う手術に伴うことを特徴とする、請求項4に記載の治療剤。
7. 心筋虚血再灌流障害が心臓移植に伴うことを特徴とする、請求項4に記載の治療剤。
8. 抗IL-8抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1, 3あるいは4に記載の治療剤。
9. 抗IL-8抗体が哺乳類のIL-8に対する抗体であることを特徴とする請求項1, 3あるいは4に記載の治療剤。
10. 抗IL-8抗体がヒトIL-8に対する抗体であることを特徴とする請求項1, 3あるいは4に記載の治療剤。
11. 抗IL-8抗体がWS-4抗体であることを特徴とする請求項1, 3あるいは4に記載の治療剤。
12. 抗IL-8抗体がヒト型化またはキメラ化された抗体であることを特徴とする請求項1, 3あるいは4に記載の治療剤。
13. 抗IL-8抗体がヒト型化WS-4抗体であることを特徴とする請求項1, 3あるいは4に記載の治療剤。

Fig. 1

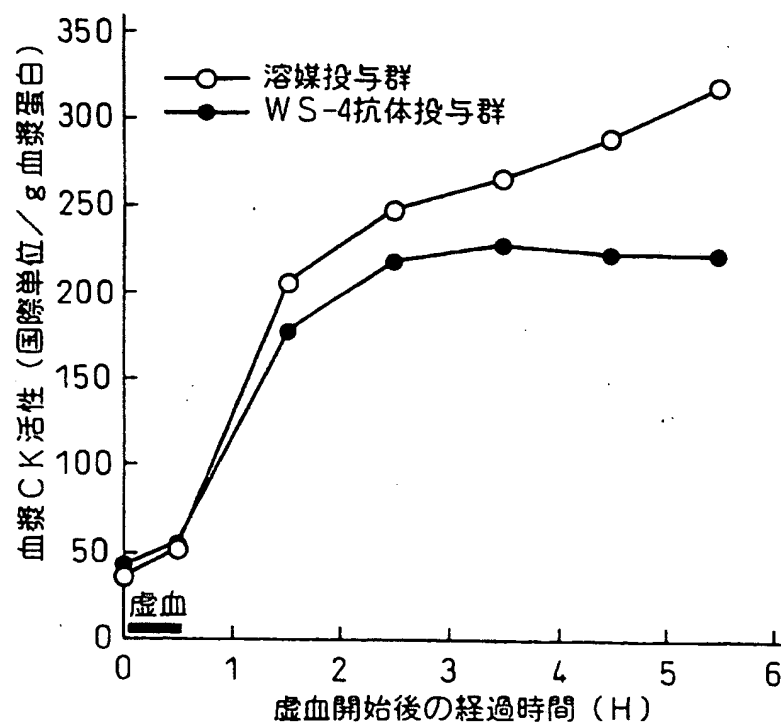
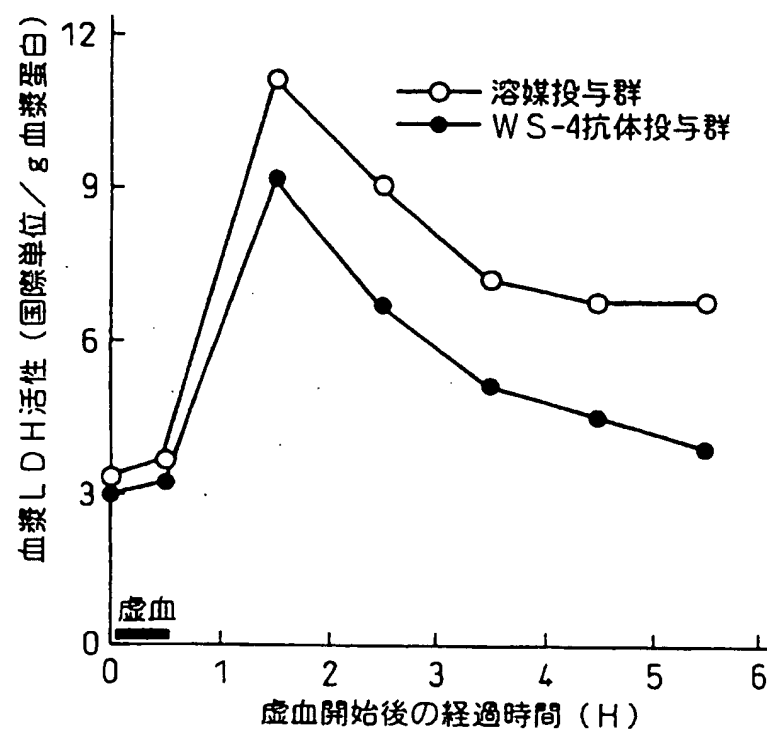


Fig.2





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01405

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. C1 <sup>6</sup> A61K39/395 // C07K16/24, C12P21/08 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. C1 <sup>6</sup> A61K39/395 // C07K16/24, C12P21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	SEKIDO, Nobuaki et al., "Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8", NATURE, 1993, Vol. 365, pp. 654-657, especially p. 657, the last paragraph	1 - 11 12, 13
Y	WO, 9602576, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), February 16, 1996 (16. 02. 96)	12, 13
A	TAKAHASHI, Masafumi et al., "Effects of endothelial interleukin-8 on neutrophil migration across an endothelial monolayer", Cardiovascular Research, 1995, Vol. 29, pp. 670-675	1 - 13
A	Tadashi Mukoda and others, "Interleukin-8 and reflow disorder (in Japanese)", Jikken Igaku, 1994, Vol. 12, No. 10, pages 65 to 67, particularly, page 67 "In conclusion" & Chemical Abstracts, 1994, Vol. 121, abstract No. 131719	1 - 13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search July 7, 1997 (07. 07. 97)		Date of mailing of the international search report July 15, 1997 (15. 07. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/01405

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A61K39/395//C07K16/24, C12P21/08

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A61K39/395//C07K16/24, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SEKIDO, Nobuaki et al, "Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8", NATURE, 1993, Vol. 365, pp. 654-657, especially p. 657, the last paragraph	1-11
Y		12, 13
Y	WO, 9602576, A (中外製薬株式会社) 16, 02, 96	12, 13
A	TAKAHASHI, Masafumi et al, "Effects of endogenous endothelial interleukin-8 on neutrophil migration across an endothelial monolayer", Cardiovascular Research, 1995, Vol. 29, pp. 670-675	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.07.97

国際調査報告の発送日

15.07.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

沖原 下 浩

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3453

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	向田 直史 等、「インターロイキン8と再血流障害」、実験医学、1994、Vol. 12、 No. 10、第65-67ページ、特に、第67ページの「おわりに」 & Chemical Abstracts, 1994, Vol. 121, abstract no. 131719	1-13